

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11151097 A**

(43) Date of publication of application: **08 . 06 . 99**

(51) Int. Cl

C12N 15/09

C12Q 1/68

**//(C12Q 1/68 , C12R 1:23), (C12Q
1/68 , C12R 1:245), (C12Q 1/68 ,
C12R 1:225), (C12Q 1/68 , C12R 1:46
, (C12Q 1/68 , C12R 1:24), (C12Q
1/68 , C12R 1:25)**

(21) Application number: **10260041**

(71) Applicant: **YAKULT HONSHA CO LTD**

(22) Date of filing: **14 . 09 . 98**

(72) Inventor: **WATANABE KOICHI**

(30) Priority: **19 . 09 . 97 JP 09255027**

(54) PRIMER FOR LACTIC ACID BACTERIUM

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new primer comprising a primer for lactic acid bacterium having a specific base sequence or a sequence complementary to the base sequence and capable of rapidly and simply carrying out identification and detection of lactic acid bacterial strains.

SOLUTION: This new primer or probe for lactic acid bacteria has a base sequence represented by formula I to V, etc., or a sequence complementary to the base sequence and a lactic acid bacterial strain can be rapidly, simply and highly precisely identified without culturing bacterium at a low cost from a fermented milk product. Analysis, etc., of intestinal flora is carried out by combining with other strain-specific primer, etc., and state of digestive tract can be grasped from the result and prevention and treatment of various diseases are made ready. The primer is obtained by designating species-specific sequence, based on 16SrRNA of bacterium obtained from data base and gene sequence of 16SrRNA detoxified this time and synthesizing the DNA by using a DNA synthesizer.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

acagattcac ttccggcg 17

I

cgagttctcg ttgtatgatc 19

II

ggtgatttgt tggacgct 18

III

gatgaatttg gtgcattgcac cag 23

IV

gcagatttac ttccggtaatg acgc 24

V

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-151097

(43)公開日 平成11年(1999)6月8日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 N 15/09

C 12 Q 1/68

// (C 12 Q 1/68

C 12 R 1:23)

(C 12 Q 1/68

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00

C 12 Q 1/68

ZNAA

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-260041

(71)出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(22)出願日 平成10年(1998)9月14日

(72)発明者 渡辺 幸一

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ

クルト本社内

(31)優先権主張番号 特願平9-255027

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(32)優先日 平9(1997)9月19日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(54)【発明の名称】 乳酸菌用プライマー

(57)【要約】

【解決手段】 配列番号1～11、14、16及び18
～21から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な
配列を有する乳酸菌用プライマー、並びにこのプライマー
を使用するビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定・
検出法。

【効果】 菌の培養が不要で、迅速、簡便に乳酸菌菌種
の同定・検出を行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1～11、14、16及び18～21から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有する乳酸菌用プライマー又はプローブ。

【請求項2】配列番号1と12、2と13、3と14、4と13、5と13、6と13、7と15、8と13、9と16、10と16、11と17、18と19及び20と21から選ばれる2つの塩基配列の組合せ又はこれら塩基配列の組合せに相補的な配列を有する乳酸菌用プライマー。

【請求項3】請求項1又は2記載のプライマーの1又は2以上を使用することを特徴とする乳酸菌菌種の同定方法。

【請求項4】請求項1又は2記載のプライマーの1又は2以上を使用することを特徴とする乳酸菌の菌種特異的検出方法。

【請求項5】(1)検体中のDNAを抽出する工程及び(2)請求項1又は2記載のプライマーの1又は2以上を用いてPCR反応を行う工程を含む請求項4記載の乳酸菌の種特異的検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乳酸菌菌種の同定に有用なDNAプライマー及びプローブ並びにこれを用いる乳酸菌菌種の同定・解析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】人の小腸及び大腸に生息するラクトバチルス(*Lactobacillus*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属細菌等の乳酸菌はビフィズス菌とあわせ、腸内の健康を維持するために有用な細菌である。このため、乳酸菌はヨーグルト、乳酸菌飲料、チーズなどに代表される発酵乳製品の製造、発酵法による乳酸の生産など様々な分野で利用されている。また、従来から、乳酸菌は腸管内の腐敗防止作用を有することが認識されており、近年では抗ガン作用、免疫賦活作用等種々の生理活性が存在することもわかっている。

【0003】従って、発酵乳製品中の乳酸菌を迅速、確実に検出し、菌種同定することは品質管理上非常に重要なことである。通常菌種の同定は、主に表現形質、すなわち、糖分解性状、発酵生産物(乳酸等)、一般生物学的性状等を検査することにより行われている。しかしながら、表現形質を基にした同定法は、操作が煩雑で多大な時間と労力を要し、試験者の熟練を要する。また、培地上のコロニー数が多くなると、コロニー同士が重なるなどしてしまい、菌数の少ないものを検出できない場合もあった。

【0004】また、近年では、DNA-DNA相同性試験による判定も行われるようになっている。(Ezaki, T., et al. (1989) INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMAT

IC BACTERIOLOGY 39, 224-229)。しかしながら、この同定法も長時間を必要とし、迅速な品質管理を行うには好ましいものではなかった。

【0005】一方、ビール業界等では、乳酸菌による汚染を簡便に検出する試みとして、プライマーを用いる検出が行われている。例えば、特開平5-15400号公報には、ビール製造において汚染の原因となる乳酸菌を選択的に検出できるオリゴヌクレオチドプライマーが開示されている。また、特開平6-90793号公報に

は、ラクトバチルス属の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子との間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出することで、ラクトバチルス属細菌を検出する方法が開示されている。

【0006】しかしながら、これらの方法では、目的とする乳酸菌等を検出することはできても、乳酸菌を種特異的に検出し、菌叢の同定、解析を行うことは不可能であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】このように、発酵性状の違いやDNA-DNA相同性試験から乳酸菌菌種の同定・解析を行うには、長時間を要し、また操作が煩雑である等の問題があった。また、乳酸菌の検出等に使用されているプライマーは以前から存在しているものの、種特異的なプライマーは見出されていなかったため、プライマーを用いて乳酸菌の菌種同定操作の簡便化、迅速化をはかることは不可能であった。

【0008】従って、本発明の目的は、乳製品や腸内細菌叢中の乳酸菌を迅速、簡便に解析し、同時に菌種の同定をも行うことのできる乳酸菌菌種特異的プライマーを提供することにある。また、本発明は該プライマーを用いた細菌叢の解析及び乳酸菌菌種の同定方法を提供することも目的としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】斯かる現状に鑑み本発明者は銳意研究を行ったところ、乳酸菌の菌種に特異的な塩基配列を有するDNAプライマーを見出し、これを用いれば、細菌の培養を行うことなく、検体から抽出した細菌由來のDNAのPCR反応により、迅速かつ簡便に乳酸菌の菌種の同定・解析が可能となることを見出し本発明を完成した。

【0010】すなわち本発明は、配列番号1～11、14、16及び18～21から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有する乳酸菌用プライマー又はプローブを提供するものである。

【0011】また本発明は、配列番号1と12、2と13、3と14、4と13、5と13、6と13、7と15、8と13、9と16、10と16、11と17、18と19及び20と21から選ばれる2つの塩基配列の組合せ又はこれら塩基配列の組合せに相補的な配列を有する乳酸菌用プライマーを提供するものである。

【0012】更に本発明は、上記の乳酸菌用プライマーの1又は2以上を使用することを特徴とする乳酸菌菌種の同定方法を提供するものである。

【0013】更にまた、本発明は、上記の乳酸菌用プライマーの1又は2以上を使用することを特徴とする乳酸菌の菌種特異的検出方法を提供するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】乳酸菌菌種の分類に関しては、近年CollinsらやDicksら、Moriらによって様々な提唱がなされている。このため、分類については未だ再考の余地があるものの、本発明においてはDicksらに従うこととした。すなわち、ラクトバチルス・カゼイの関連菌種に関しては、従来のラクトバチルス・ゼアエに、ラクトバチルス・パラカゼイ（基準株ATCC 334）をラクトバチルス・カゼイに変更し、ラクトバチルス・パラカゼイの菌種名を却下することとした。

【0015】上記のような分類において、種特異的なプライマーを作成するにあたり、そのターゲットには、系統分類の指標として信頼性の高い16S r RNA遺伝子を用い、同定・解析には、PCR法等の手段が必要となるため、RNAでなくDNAを用いた。

【0016】プライマーは、本発明者がシークエンスを行って塩基配列とデータベース（DDBJ Genbank等）に登録されている得た塩基配列とを比較・検討することにより得たものである。ここで本発明者が比較対象として新たに16S r RNA遺伝子のシークエンスを行った菌種（基準株）は、具体的には、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）ATCC 4356株、ラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）NCDO 151株、ラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）ATCC 334株、ラクトバチルス・クリスピタス（*Lactobacillus crispatus*）JCM 1185株、ラクトバチルス・デルブルッキィ（*Lactobacillus delbrueckii*）ATCC 9649株ラクトバチルス・ファーメンタム（*Lactobacillus fermentum*）ATCC 14931株、ラクトバチルス・ガリナラム（*Lactobacillus gallinarum*）JCM 2011株、ラクトバチルス・ガセリ（*Lactobacillus gasseri*）DSM 20243株、ラクトバチルス・ヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）ATCC 15009株、ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）JCM 1112株、ラクトバチルス・ラムノーザス（*Lactobacillus rhamnosus*）ATCC 7469株、ラクトバチルス・ゼアエ（*Lactobacillus zeae*）ATCC 393株、ラクトバチルス・ゼアエ（*Lactobacillus zeae*）DSM 20178株、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス（*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*）ATCC 19257株、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシ

ーズ、ラクチス（*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*）ATCC 19435株である。これらの配列は、遺伝研データベースDDBJに登録する予定である。

【0017】ラクトバチルス属の菌種間でアライメントしたところ、大腸菌のナンバリングでV1領域とV2領域にバリエーションがあったので、この領域をターゲットとしてPCRプライマーを設計した。また、オリゴヌクレオチドの長さは、プライマーによって異なっており、17～26 b. pとなっている。これらは操作上最も好適な長さであるが、使用に際しては、各々の16S r RNA遺伝子中において、該オリゴヌクレオチドに隣接する数～数十b. pの塩基配列を増減させたものを用いても良い。このようにして得られたプライマーのうち、配列番号1記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、乳酸菌菌種の同定、解析を行うためのプライマーやプローブとして使用することができる。プライマーとしては、公知の乳酸菌用ユニバーサルプライマー等と組合わせて用いることも可能であるが、その組合せによっては種特異的な検出を行えないものもあるので、配列番号12記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと組合わせることが望ましい。同様の理由から以下においても使用に好ましい組合せとなるものを示す。

【0018】配列番号2記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号13記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0019】また、配列番号3及び14記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・デルブルッキィ（*Lactobacillus delbrueckii*）に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしてはこの両者を組合わせて用いることが好ましい。

【0020】また、配列番号4記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ガセリ（*Lactobacillus gasseri*）に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号13記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0021】また、配列番号5記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）及びラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号13記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。このプライマーは、単独で使用しても上記2種類を区別できないものの、配列番号1に記載のプライマーと併用すれば判別可能である。

【0022】また、配列番号6記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ジョンソニー（*Lactobacilli*

s johnsonii) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号13記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0023】また、配列番号7記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ラムノーザス (Lactobacillus rhamnosus) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号15記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0024】また、配列番号8記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ゼアエ (Lactobacillus zea e) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号13記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0025】また、配列番号9記載の塩基配列を有するものは、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ・クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号16記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。

【0026】また、配列番号10記載の塩基配列を有するものは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ・ラクチス (Lactococcus lactis subsp. lactis) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号16記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。ここで、配列番号16記載のプライマーは、ラクトコッカス・ラクチスに特異的なプライマーであるので、サブスピーシーズまでの同定を必要としない場合には、このプライマーを用いても菌種同定は可能である。

【0027】また、配列番号11記載の塩基配列を有するものは、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては配列番号17記載の塩基配列を有するものと組合わせて用いることが好ましい。また、配列番号18及び19記載の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ファーメンタム (Lactobacillus fermentum) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては、この両者を組合わせて用いることが好ましい。

【0028】また、配列番号20及び21の塩基配列を有するものは、ラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) に特異的なDNAオリゴヌクレオチドであり、プライマーとしては、この両者を組合わせて用いることが好ましい。

【0029】上記の配列番号1～11、14、16及び18～21から選ばれる塩基配列に相補的な配列を有するものも乳酸菌用のプライマー又はプローブとして用いることができ、配列番号12、13、15及び17から選ばれる塩基配列に相補的な配列を有するものも配列番号12、13、15及び17のものと同様に使用するこ

とができる。

【0030】上記のように設計したオリゴヌクレオチドプライマーは、その塩基配列に従い、DNA合成機により、人工的に合成される。その種特異性は、乳酸菌34種120株とビフィズス菌4種4株のDNAに対するプライマーのバンド形成能を指標として確認した。結果として、上記全ての菌種の特異性に問題はなかった。

【0031】なお、今回新たにシークエンスを行ったことにより、配列番号1～11、14、16、18～21に示す配列以外にも種特異的な配列が見出されている。

しかしながら、これらの配列や他の公知のプライマーで同定を行っても、別の種に属する株と反応したり、目的とする種の株と反応しない場合も多く、使用上好ましいものではなかった。例えばこれらのプライマーを用いてもPCR反応時の条件設定によって種特異的を反応性は達成されるものと考えられるが、現状ではそのような条件は見出されていない。

【0032】また、発酵乳製品から乳酸菌を種特異的に検出することが可能であるかについても次のようにして

20 検討した。まず、市販の発酵乳製品26サンプルに含有されている乳酸菌を単離し、その種をDNA-DNA相同性試験から同定する。次に、生化学的性状試験を行い、亜種(subspecies)の同定を行う。すなわち、ラクトバチルス・デルブルッキ (Lactobacillus delbrueckii) に関しては、Sucrose及びLactoseの発酵性の有無でデルブルッキ、ブルガリカス及びラクチスの判別を行い、ラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis) に関しては、4%の食塩を添加したMRS broth培地における増殖性の有無やアルギニンを添加した培地でのアンモニア産生能等からラクチスとクレモリスとの判別を行った。このようにして得た菌種の同定結果を、本発明のプライマーによる同定結果と比較したところ両者は一致していた。

【0033】本発明のプライマーは、このように種特異性を有するため、これらを用いて発酵乳製品中の乳酸菌菌種を迅速に同定できる。また、乳酸菌用選択培地であるBCP加コロニーカウント寒天培地(栄研化学社製)等に形成されたコロニーから直接、あるいは培養した菌体からDNAを抽出し、各プライマーとの反応性を調べることによって菌種の簡易同定を行うことができる。

【0034】また、本発明のプライマーを用いれば、培養を行うことなく各個体の菌種レベルでの分布の調査が可能である。このような方法としては、まず、(1)検体中のDNAを抽出し、(2)次いで該DNAに対して本発明のプライマーを用いてPCR反応を行う方法が挙げられる。以下、このPCR法について、より詳細に説明する。

【0035】例えば、発酵乳製品中の菌種同定は、次のようにして行われる。まず、発酵乳1mlを遠心分離して得られるペレットから塩化ベンジル法等によってDNA

を抽出し、これを錆型DNAとする。この錆型DNAに本発明のプライマーを組合わせ、増幅反応を行うことにより、種特異的なDNA配列（PCR産物）を得ることができる。このようにして得られたDNAを電気泳動すれば、バンドの有無と用いたプライマーから菌種を同定することができる。このように、コロニーや発酵乳製品から抽出したDNAを錆型とし、本発明のプライマーを用いて菌種の同定を行うと、従来の方法では検出限界以下であった菌株や種の判別が困難であった菌株も簡便に検出することが可能となる。

【0036】DNAを抽出する方法としては、定法であるMarmur法、その変法である酵素法、及び簡便法である塩化ベンジル法が好ましい。これらの方法は多少煩雑になるものの、酵素法において、幅広い菌種から収率よくDNAを抽出できる。また、純粋培養した細菌等から抽出したDNAに対しては、前述の方法の他、フェノール法等も好適に使用しうる。

【0037】通常、PCR法等にプライマーを使用する際には、2種類のプライマーを1組として用いることが好ましい。例えば、配列番号1及び12に係るプライマーを用いれば、多種類存在する細菌群のうち、ラクトバチルス・アシドフィルスのDNAにおいてのみ、両者のプライマー間で増幅反応が起り、これを同定することができる。本発明のプライマー2種類を組にして用いる場合は、両者がリーディング鎖とラギング鎖との組合せになるようにする必要がある。すなわち、配列番号1～11、18及び20に係るプライマーをリーディング鎖と反応するように設計した場合は、前述の如く配列番号12～17、19、21に係るプライマーはラギング鎖と反応するように設計する必要がある。また、配列番号14、16、19、21記載のプライマーをリーディング鎖と反応するように設計した場合には、これに対応するプライマーをラギング鎖と反応するように設計する必要がある。また、PCRを行う際に、錆型のDNA量を段階希釈し、同様の解析を行えば、目的とする菌種の定量化も可能である。このようにして得られたDNAを電気泳動すれば、バンドの有無と用いたプライマーから菌種を同定することができる。

【0038】また、本発明のプライマーのうち、配列番号1～11、14、16、18～21に示すものは、菌 40 種特異的な配列を有しているため、単独でもプローブと*

*して使用できる。配列番号5記載のプライマーは、ラクトバチルス・アシドフィルス及びラクトバチルス・ヘルベティカスの両方とバンドを形成してしまうが、配列番号1のプライマーと併用すればラクトバチルス・ヘルベティカスを同定するプローブとして使用できる。更に、配列番号1～11、14、16、18～21のプライマー単独もしくは複数は、他の公知のユニバーサルプライマーやオリゴヌクレオチドとを組合合わせても用いることができる。

10 【0039】また、本発明プライマーを用いれば、ヒト、動物等の腸内細菌叢等の解析も行える。現状では、乳酸菌の菌種以外を検出することは不可能であるものの、乳酸菌の分布、菌数がわかれば、健康状態等様々な情報が得られる。更に、その他の多岐にわたる細菌のプライマー、例えば本出願人が特願平9-219567号において記載しているビフィドバクテリウム属細菌用プライマー等と組合させて用いれば、有用細菌叢の全体像を把握することも可能である。

【0040】

20 【発明の効果】本発明のプライマーを使用すれば、発酵乳製品等から菌を培養することなく、迅速、簡便、低コスト且つ高精度に乳酸菌菌種の同定を行うことができる。また、他の菌種特異的なプライマー等と組合せて使用することで、腸内細菌叢の解析等を行なうことができる。更に、解析の結果から消化管等の状態が把握できるため、種々疾病等の予防・治療が容易になる。

【0041】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

30 【0042】実施例1 プライマーの設計及び合成：DDBJ、Genbank等のデータベースより得られた細菌の16S rRNA遺伝子配列と、本発明者が解読した下記の16S rRNA遺伝子配列（表1）を基に、種特異的なプライマーの設計を行った。可変領域のうち大腸菌のナンパリングにおけるV1エリア、V2エリア及び3エリアに菌種特異的配列が認められたので、これをターゲットとしてプライマーを作成した。こうして設計した塩基配列に従い、DNA合成機を用いてプライマーを合成した。このデータを表2に示す。

【0043】

【表1】

プライマーを設計するにあたり新たに 16S rDNA 塩基配列を
決定した菌種

菌種	由来
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334
<i>Lactobacillus casei</i>	NCDO 151
<i>Lactobacillus crispatus</i>	JCM 1185
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. <i>delbrueckii</i></i>	ATCC 9649
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 14931
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	JCM 2011
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009
<i>Lactobacillus reuteri</i>	JCM 1112
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469
<i>Lactobacillus zae</i>	ATCC 393
<i>Lactobacillus zae</i>	DSM 20178
<i>Lactococcus lactis subsp. <i>cremoris</i></i>	ATCC 19257
<i>Lactococcus lactis subsp. <i>lactis</i></i>	ATCC 19435

【0044】

【表2】

乳酸菌用菌種特異的プライマー

配列番号	プライマー名	配列	塩基数	位置*	プロダクトサイズ	目的微生物
1	LbA-1	Forward Reverse	5'-ACAGATTCACTCGTGTG-3' 5'-AAAGGCCACTTACTCTTATC-3'	17 23	78-94 476-454	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
12	LbA-2	Forward Reverse	5'-CCAGTTCTGGTGTGATC-3' 5'-AACATTCCCTACTCTGCC-3'	19 19	67-78 368-350	<i>Lactobacillus casei</i>
2	LbC-1	Forward Reverse	5'-GGTCATTGTTGGAGCT-3' 5'-AAAGCCAGTTACTGCCCTATC-3'	18 23	94-100 476-454	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
13	LbC-2	Forward Reverse	5'-CATGAATTGGTGCTGCCACAG-3' 5'-AACATTCCCTACTCTGCC-3'	23 19	76- 368-350	<i>Lactobacillus gasseri</i>
3	LbD-1	Forward Reverse	5'-GGAGATTACTGGTGTGACCA-3' 5'-AACATTCCCTACTCTGCC-3'	24 19	78- 368-350	<i>Lactobacillus helveticus</i>
14	LbD-2	Forward Reverse	5'-GATGATTTAGTGTTGCCACTAA-3' 5'-GATGATTTAGTGTTGCCACTAA-3'	23 23	76-98 368-350	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
4	LbG-1	Forward Reverse	5'-AACATTCCCTACTCTGCC-3' 5'-GGAGATTACTGGTGTGACCA-3'	19 24	368-350 57-73	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
13	LCBC-2	Forward Reverse	5'-GGAGTCGAAGAGTTCTGATTAT-3' 5'-GGCACACAGTACTCTGCCGACCA-3'	26 26	476-453 368-350	<i>Lactobacillus zeae</i>
5	LbR-1	Forward Reverse	5'-CCGTTTTCGTCGAC-3' 5'-AACATTCCCTACTCTGCC-3'	19 19	67-78 368-350	<i>Lactobacillus fermentum</i>
13	LbR-2	Forward Reverse	5'-GGGACACAGTACTCTGCCGAC-3' 5'-CCGTTTTCGTCGAC-3'	23 19	89-100 479-444	<i>Lactobacillus reuteri</i>
8	LbZ-1	Forward Reverse	5'-ACCTATGACAGTACTCTACCT-3' 5'-CTCGTGTGACAGTACTCTACCT-3'	26 21	72- 479-444	<i>Lactococcus lactis subsp.</i> <i>cremoris</i>
13	LCBC-2	Forward Reverse	5'-GATTGATGTTGCTGCCAC-3' 5'-CTCGTGTGACAGTACTCTACCT-3'	26 23	479-444 76-99	<i>Lactococcus lactis subsp.</i> <i>lactis</i>
18	LFer-1	Forward Reverse	5'-ATGGTCTGACCAATTGCAA-3'	50	412	<i>Streptococcus thermophilus</i>
19	LFer-2	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	26	479-455	
20	LReu-1	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	23	76-99	
21	LReu-2	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	20	479-455	
9	LcC-1	Forward Reverse	5'-ATGGTCTGACCAATTGCAA-3'	19	479-461	
16	LcC-2	Reverse Forward	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	26	479-455	
10	LcL-1	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	23	76-99	
16	Lcc-2	Reverse Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	20	186-205	
11	ST-1	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'	19	479-461	
17	ST-2	Forward Reverse	5'-CTTGATGAGCTTCCACTCTACCAA-3'			

*: E.coli 16S rRNA numbering systemによる

【0045】実施例2 プライマーを用いた標準株及び基準株の菌種同定：本発明のプライマーが、実際に種特異性を有しているかを確認するため、各菌種の標準株及び基準株とプライマーとの反応性を検討した。

(1) 菌株の純粋培養及びDNAの抽出

表3～表7に示す、34菌種120株の乳酸菌をMRS broth培地(Difco社製)にて一晩純粋培養し、また、発酵乳製品に利用されているビフィズス菌として4種4株を1%glucose添加のGAM broth(ニッスイ社製)にて嫌気的に一晩培養した。こうして得た

菌体124種類々から、塩化ベンジル法(Zhu, H. et al (1993) Nucleic Acid Research 21, 5279-5280)により、DNAを抽出した。すなわち、MRS brothを用いた一夜培養菌液1.5mlの遠心菌体にExtraction buffer(100mM Tris, 40mM EDTA, pH9.0) 250μl、ベンジルクロリド150μl, 10%SDS 50μlを加え、50℃で30分間激しく振とうした。3M酢酸ナトリウム150μlを加えて氷中で15分静置した後、15,0

0 0 rpm、10分間の遠心で得られた上清をイソプロパノールで沈殿させ70%エタノールで洗浄した。沈殿を50μlのTE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1mM EDTA) に溶かして濃度を測定し、10μg/mlの濃度に調製して鋳型DNA溶液とした。

【0046】(2) PCR反応

総量を25μlとし、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、200μM dNTP mixtureに、各々0.8μMプライマー、1.0U Taq DNA polymerase (タカラ社製)、1.0ng 鋳型DNAを含む反応液で、DNAサーマルサイクラーP J 480 (タカラ社製)により、94℃20秒、55℃20秒、72℃30秒を30サイクルのPCR反応を行った。

【0047】(3) プライマーの菌種特異性の検討
PCR反応によって得られたPCR産物を電気泳動し、バンドの有無によりプライマーを各菌株のDNAとの結合能を確認することにより、プライマーの特異性を判定した。1.5%アガロース (Molecular Biology Certified Agarose; バ*

* イオラッド社製) でMu p i d - 2 (コスモ・バイオ)により100V、25分電気泳動し、Ethidium Bromide (0.5mg/ml) で染色後、UVランプ下でバンドを観察した。その結果は、表3~7に示すとおりであり各プライマーは菌種特異的であった。LbHはラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) のみならずラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) にも反応が認められた。しかしながら、プライマーLbAとの組合せによりこれら2菌種を同定することが可能であった(表3、表4)。また、同様にLbRにおいてもラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) の数株と弱い反応が認められたがLbCとの組合せによりラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) とラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) の2菌種を同定することが可能であった(表4、表5)。

【0048】

【表3】

16S rRNA塩基配列に基づく菌種特異的なprimerの特異性

菌 株	由 来	PCRでの結果*										
		LbA	LbG	LbJ	LbD	LbH	LbC	LbZ	Lcc	Lcl	ST	LPer
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NIRD A-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NIRD A-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	type** ATCC 4356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	JCM 1028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	JCM 1229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4796	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 314	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFB 104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4963	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 9857	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 19992	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM 5813	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM 1025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 29601	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM 1026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	NCFB 2174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	NCFB 2470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 11506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	JCM 1017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	JCM 1022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCFB 1060	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbreueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NIRD B-1(1b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbreueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NIRD B-8(3501)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbreueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NIRD B-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbreueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NIRD B-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0049】

【表4】

16S rRNA塩基配列に基づく菌種特異的なprimerの特異性

【0050】

菌 株	由 来	PCRでの結果*										
		LbA	LbG	LbJ	LbD	LbH	LbC	LbZ	LcC	LcL	ST	LFeR
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgarius</i> type	ATCC 11842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> type	ATCC 9649	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> subsp. <i>lactis</i>	NIRD L-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> subsp. <i>lactis</i>	NIRD L-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> subsp. <i>lactis</i>	NIRD L-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 12315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 4797	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NIRD H-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NIRD H-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NIRD J-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NIRD J-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	JCM 5807	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	NIRD C-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	NIRD C-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	NIRD C-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	NIRD A-121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 27216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 4646	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	NCDO 151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 25599	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM 1181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	PERM P-5852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 7469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 9595	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 11981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【表5】

16S rRNA塩基配列に基づく菌種特異的なprimerの特異性

菌 株	由 来	PCRでの結果*										
		LbA	LbG	LbJ	LbD	LbH	LbC	LbZ	LbR	LcI	ST	LReu
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 11982	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 14957	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus zae</i>	type ATCC 393	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus zae</i>	DSM 20178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	type ATCC 14931	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0308	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0366	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0380	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	YIT 0381	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	type JCM 1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	YIT 0315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	YIT 0316	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	ATCC 14365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	ATCC 19257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	FERM P-15769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 19435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	FERM P-16074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NCDO 509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	FERM P-1767	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 14485	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【表6】

【0051】

16S rRNA塩基配列に基づく菌種特異的 primerの特異性

PCRでの結果*

菌 株	由 来	PCRでの結果*											
		Lba	Lfg	Lbj	Lbd	Lbh	Lbc	Lhr	Lm	Lcc	Lcl	ST	LPer
<i>Streptococcus thermophilus</i>	PERM P-15933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	type ATCC 19258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NCDO 1469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	type JCM 1125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	type JCM 1026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	JCM 1034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bifidus</i>	type JCM 1094	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	type ATCC 14869	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0416	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0421	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0423	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0424	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	YIT 0435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	type ATCC 4005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	YIT 0440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus corniformis</i> subsp. <i>corniformis</i>	type JCM 1164	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	type JCM 1185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	type JCM 2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus malerefahrens</i>	type NRRL 1779	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus oris</i>	type JCM 9505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	type DSM 8573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paraplatanarum</i>	type DSM 10641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	type DSM 10667	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	type JCM 1558	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	type ATCC 14917	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	type DSM 8475	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i>	type JCM 1157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0052】

【表7】

16S rRNA塩基配列に基づく菌種特異的primerの特異性

菌 株	由 来	PCRでの結果*										
		LbA	LbG	LbJ	LbD	LbH	LbC	LbZ	LcC	LcL	ST	Lfer
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	type ATCC 11742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	type ATCC 11741	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	type JCM 1186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	type JCM 9305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus garviae</i>	type NCFB 2155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	type ATCC 29071	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus plantarum</i>	type ATCC 43199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	type ATCC 43920	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	type JCM 1190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	type IFO 14252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	type ATCC 15700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	type ATCC 15707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: + : 反応あり、- : 反応なし、W : 反応弱い
 LbA, *Lactobacillus acidophilus*; LbC, *Lactobacillus casei*; LbD, *Lactobacillus delbrueckii*; LbG, *Lactobacillus gasseri*; LbH, *Lactobacillus helveticus*; LbJ, *Lactobacillus johnsonii*; LbR, *Lactobacillus rhamnosus*; LbZ, *Lactobacillus zelandicus*; LcC, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; LcL, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; ST, *Streptococcus thermophilus*; Lfer, *Lactobacillus fermentum*; LReu, *Lactobacillus reuteri*.

【0053】実施例3 プライマーを用いた発酵乳製品中の乳酸菌の菌種同定

市販の発酵乳製品26種類を用い、発酵乳製品等からの分離株についても本発明のプライマーが適用可能であるかを検討した。

(1) DNAの抽出

発酵乳1mlをBCP加プレートカウント寒天培地上に塗

抹し、37℃で72時間培養を行った。次いで、出現したコロニーから単コロニー分離を3回行うことにより純培養を得、実施例2と同様に塩化ベンジル法にてDNAを抽出した。

(2) PCR反応

(1)で得られたDNAを鋳型とし、実施例2と同一の条件でPCR反応を行った。

(3) プライマーの菌種特異性の検討

発酵乳製品から単離した菌株の種は、DNA-DNAホモジーから同定した。ラクトバチル・デルブルッキイ (*Lactobacillus delbrueckii*) 及びラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) の亜種（サブスピーシーズ）は生化学的性状試験により判別した。すなわち、ラクトバチルス・デルブルッキイ (*Lactobacillus delbrueckii*) に関してはSucrose 及びLactose の発酵性の有無でデルブルッキイ、ブルガリカス及びラクチスの判別を、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis* *10

* s) に関してはMRS液体培地に4%の食塩水を添加した培地における耐性の有無、MRS液体培地にアルギニンを添加した培地での増殖性の有無やアルギニンを添加した培地でのアンモニア産生能等からラクチスとクレモリスとの判別を行った。このようにして得た菌種の同定結果と、本発明のプライマーによる同定結果は一致していた（表8及び表9）。

【0054】

【表8】

菌種特異的なプライマーによる発酵乳製品分離株の同定

分離 サン アル*	菌種名**	PCRでの結果***										PCRによる同定結果	
		Lba	Lbc	Lbd	Lbg	Lbh	Lbj	Lbr	Lbz	Lcc	Lcl	ST	
Y94030	A <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y94050	B <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y95034	C <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y95040	D <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y95055	E <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y96034	F <i>Lb.acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.acidophilus</i>
Y96001	G <i>Lb.casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
Y96039	H <i>Lb.casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
Y94027	I <i>Lb.casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
Y94029	A <i>Lb.casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
Y96009	J <i>Lb.casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.casei</i>
Y96002	G <i>Lb.delbrueckii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
Y96010	J <i>Lb.delbrueckii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
Y94060	K <i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
Y93047	L <i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
Y94041	M <i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.delbrueckii</i>
Y91028	N <i>Lb.gasseri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.gasseri</i>
Y93051	O <i>Lb.gasseri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.gasseri</i>
Y95040	P <i>Lb.helveticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.helveticus</i>
Y96033	F <i>Lb.helveticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.helveticus</i>
Y97013	Q <i>Lb.helveticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.helveticus</i>
Y94013	Q <i>Lb.johnsmii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.johnsmii</i>
Y94074	R <i>Lb.johnsmii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.johnsmii</i>
Y95049	S <i>Lb.johnsmii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.johnsmii</i>
Y94051	B <i>Lb.rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.rhamnosus</i>
Y94057	T <i>Lb.rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.rhamnosus</i>
Y94070	U <i>Lb.rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.rhamnosus</i>
Y95025	V <i>Lb.rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.rhamnosus</i>
Y97003	W <i>Lb.rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.rhamnosus</i>
Y95036	F <i>Lb.reuteri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb.reuteri</i>

【0055】

【表9】

菌種特異的なプライマーによる発酵乳製品分離株の同定

分離 菌株	サン プル*	菌種名**	PCRでの結果***										PCRによる同定結果	
			LbA	LbC	LbD	LbG	LbH	LbJ	LbR	LbZ	LcC	LcL	ST	
Y 96008	J	<i>Lb. reuteri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ <i>Lb. reuteri</i>
Y 93048	O	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>
Y 94066	U	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>
Y 95057	B	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cermoris</i>
Y 93049	O	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Y 95042	D	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Y 97005	X	<i>Lc. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Y 94049	B	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>
Y 94055	V	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>
Y 94072	R	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>
Y 95041	D	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>
Y 95050	S	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>
Y 95053	Z	<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <i>S. thermophilus</i>

*: 発酵乳製品 26 品目

**: マイクロプレートによるDNA-DNAハイブリダイゼーションによってスピーザーズを、生化学的性状の追加試験でサブスピーザーズをそれ

***: +: 反応あり、-: 反応なし、W: 反応弱い、
ぞれ同定した。LbA, *Lactobacillus delbrueckii*; LbG, *Lactobacillus gasseri*;
LbH, *Lactobacillus casei*; LbJ, *Lactobacillus johnsonii*; LbR, *Lactobacillus rhamnosus*; LbZ, *Lactobacillus zeae*;
LcC, *Lactobacillus helveticus*; LcL, *Lactobacillus fermentum*; ST, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; ST, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; LFer, *Lactobacillus thermophilus*; LReu, *Lactobacillus reuteri*.

【0056】実施例4 発酵乳製品中からの乳酸菌の直接的同定

市販の発酵乳製品16種類を用い、乳製品中の菌株を培養することなく菌種同定を行えるかを検討した。

(1) DNAの抽出

発酵乳製品からのDNAの抽出は、発酵乳1mlを15,000rpm、5分の遠心によって得られた沈殿をサンプルとして、実施例2記載の塩化ベンジル法によって行つ

た。抽出されたDNAはTE bufferに溶解し、50μg/mlの濃度に調製して錆型DNA溶液とした。

【0057】(2) PCR反応

(1) 得られたDNAを錆型とし、実施例2と同一の条件でPCR反応を行つた。

【0058】(3) プライマーの菌種特異性の検討

本発明のプライマーを用いた同定結果は、表9に示すところおりであった。これを実施例3と同様の方法による発酵

乳製品分離株の同定結果と比較したところ、両者は一致しており、菌株を培養することなく菌種同定を行えることが確認された。

* 【0059】
【表10】

菌種特異的なプライマーを用いた培養なしで行う発酵乳製品中の乳酸菌の同定

発酵乳製品	PCRでの結果*										製品中に存在が確認できた菌種
	LbA	LbC	LbD	LbG	LbJ	LbK	LbR	LbZ	LcC	LcL	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. johnsonii, S. thermophilus</i>
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. delbrueckii, Lb. johnsonii, S. thermophilus</i>
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, Lb. rhamnosus, S. thermophilus</i>
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, Lb. gassei</i>
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, Lb. rhamnosus, S. thermophilus</i>
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei, Lb. delbrueckii, S. thermophilus</i>
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei, Lb. helvetica, Lb. johnsonii</i>
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. rhamnosus</i>
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei, S. thermophilus</i>
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lb. casei</i>

* : + : 反応あり、- : 反応なし、W : 反応弱い、

【0060】

【配列表】

<110> 株式会社 ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA)
<120> 乳酸菌用プライマー
<130> P04091009
<150> JP 1997-255027
<151> 1997-9-19

<160> 21

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

acagattcac ttccggtg 17

50 <210> 2

<2 1 1> 19
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence 19
 <4 0 0> 2
 cgagttctcg ttgatgatc 19
 <2 1 0> 3
 <2 1 1> 18
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 3
 ggtgatttgt tggacgt 18
 <2 1 0> 4
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 4
 gatgaatttg gtgcttgcac cag 23
 <2 1 0> 5
 <2 1 1> 24
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 5
 gcagatttac ttccgtaatg acgc 24
 <2 1 0> 6
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 6
 gatgattta gtgcttgcac taa 23
 <2 1 0> 7
 <2 1 1> 24
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 7
 gcaagtgcga cgagttctga ttat 24
 <2 1 0> 8
 <2 1 1> 19
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 8
 cgagtttgg tcgatgaac 19
 <2 1 0> 9
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 9
 attggtgctt gcaccaattt gaa 23
 <2 1 0> 10
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA

(17) 32
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 10
 gttggtaactt gtaccgactg gat 23
 <2 1 0> 11
 <2 1 1> 20
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 11
 tggatgacac atgtcattta 20
 10 <2 1 0> 12
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 12
 aaaggccagt tactacctct atc 23
 <2 1 0> 13
 <2 1 1> 19
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 20 <4 0 0> 13
 aagatccct actgctgcc 19
 <2 1 0> 14
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 14
 aaagaccagt tactgcctct atc 23
 <2 1 0> 15
 <2 1 1> 26
 30 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 15
 gccgacaaca gttactctgc cgacca 26
 <2 1 0> 16
 <2 1 1> 26
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 16
 ctgtatgagc tttccactct caccaa 26
 40 <2 1 0> 17
 <2 1 1> 19
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 17
 ctgtgtgaac tttccactc 19
 <2 1 0> 18
 <2 1 1> 23
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 50 <4 0 0> 18

cctgattgat ttgggtcgcc aac 23
 <2 1 0> 19
 <2 1 1> 26
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 19
 acgtatgaac agttactctc atacgt 26
 <2 1 0> 20
 <2 1 1> 21
 <2 1 2> DNA

* <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 20
 gattgatggt gcttgcacct g 21
 <2 1 0> 21
 <2 1 1> 26
 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
 <4 0 0> 21
 ctgcgtgaac agttactctc acgcac 26

* 10

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 識別記号

F I

C 1 2 R 1:245)
 (C 1 2 Q 1/68
 C 1 2 R 1:225)
 (C 1 2 Q 1/68
 C 1 2 R 1:46)
 (C 1 2 Q 1/68
 C 1 2 R 1:24)
 (C 1 2 Q 1/68
 C 1 2 R 1:25)